

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年1月15日 (15.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/005497 A1(51) 国際特許分類⁷:
C12Q 1/02, A61K 45/00, A61P 3/08

C12N 5/10, 15/09,

(74) 代理人: 長井 省三, 外(NAGAI,Shozo et al.); 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008367

(22) 国際出願日: 2003年7月1日 (01.07.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-193814 2002年7月2日 (02.07.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 萩野 淳 (OGINO,Makoto) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 遠藤 英樹 (ENDOH,Hideki) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SCREENING INSULIN RESISTANCE IMPROVING DRUG

A1

(54) 発明の名称: インスリン抵抗性改善薬スクリーニング方法

WO 2004/005497 A1

(57) Abstract: It is intended to disclose a method of identifying a novel substance, which promotes the interaction between PPAR γ and RNA helicase and/or accelerates the expression of p68 RNA helicase to thereby promote the transcriptional induction activity of PPAR γ and improve insulin resistance, and a method of screening the same. The above method is a method of screening an insulin resistance improving drug of a novel type which is different from the existing PPAR agonists promoting the transcriptional induction activity of PPAR γ . It is also intended to disclose a process for producing a medicinal composition for improving insulin resistance containing, as the active ingredient, a substance which can be obtained by the above screening method.(57) 要約: PPAR γ とp68 RNAヘリカーゼとの相互作用を促進する、及び/または、p68 RNAヘリカーゼの発現を亢進することによりPPAR γ の転写誘導活性を促進しインスリン抵抗性を改善する新しい物質の同定方法およびスクリーニング方法を開示する。当該方法は、PPAR γ の転写誘導活性を促進することによる従来のPPARアゴニストとは異なる新しいタイプのインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング方法である。さらに、前記スクリーニング方法により得ることができる物質を有効成分とするインスリン抵抗性改善用医薬組成物の製造方法を開示する。

明細書

インスリン抵抗性改善薬スクリーニング方法

技術分野

本発明は、PPAR γ の転写誘導活性を促進する物質、及び／又はインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法に関する。

背景技術

インスリン抵抗性改善薬としてすでに効果が認められているチアゾリジン誘導体はペルオキシソーム増殖剤応答性受容体ガンマ (peroxisome proliferator activated receptor gamma : PPAR γ) のアゴニストとして作用することが示されている (Lehmannら、J. Biol. Chem.、第270巻、第12953-12956頁、1995年)。PPAR γ は核内受容体スーパーファミリーに属し、リガンドの結合によって活性化される転写促進因子として標的遺伝子上流にある応答配列に結合し、その転写を誘導することが知られている (Mangelsdorfら、Cell、第83巻、第835-839頁、1995年)。PPAR γ アゴニストは細胞の増殖を停止し、細胞分化を促進することが報告されている (Kitamuraら、Jpn. J. Cancer Res.、第90巻、第75項、1999年)。PPAR γ は特に脂肪組織で発現が認められ (Tontonozら、Genes and Development、第8巻、第1224-1234頁、1994年、Tontonozら、Cell、第79巻、第1147-1156頁、1994年)、ホモ欠損型マウスでは脂肪細胞の分化誘導が起こらない。またPPAR γ のアゴニストとして作用するチアゾリジン誘導体の投与は大型脂肪細胞の減少と小型脂肪細胞の増加を引き起こす (Kubotaら、Mol. Cell、第4巻、第597-609頁、1999年)。以上の知見から、チアゾリジン誘導体がインスリン抵抗性を改善する機構はPPAR γ アゴニストが急速に脂肪細胞の分化を促進する結果、インスリン抵抗性誘発原因物質であるTNF α の産生抑制、末梢組織でのグルコーストランスポーター発現の促進、遊離脂肪酸産生の抑制が起こり、結果、細胞内への糖取り込みが亢進して高血糖が改善されると考えられている (Lehmannら、J. Biol. Chem.、第270巻、第12953-12956頁、1995年)。チアゾリジン誘導体の

PPAR γ との親和性は生体内の血糖降下作用と相關することから、該化合物群のインスリン抵抗性改善作用はPPAR γ の活性化を介した作用であると考えられている (Willsonら、J. Med. Chem.、第39巻、第665-668頁、1996年)。このようなことからPPAR γ の転写誘導活性を促進することはインスリン抵抗性を改善すると考えられ、そのため、PPAR γ のアゴニストの検出方法はインスリン抵抗性糖尿病治療薬をスクリーニングする有効な手法であると考えられてきた。

しかしながら近年チアゾリジン誘導体を用いた臨床での知見から、PPAR γ のアゴニスト作用を持つ従来の合成リガンドは、インスリン抵抗性改善作用のみでなくいすれも肝臓機能障害を引き起こし、また生体内の循環血漿量を増大させて浮腫を惹起することが報告された（非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3参照）。このPPAR γ の合成アゴニストによる肝臓機能障害は重篤な副作用であり、浮腫の惹起も心肥大等をもたらす重篤な副作用であることからインスリン抵抗性改善という主作用との乖離が強く望まれている。しかし、これまでにチアゾリジン誘導体がこのような副作用をもたらす分子メカニズムは解明されていない。

一般に核内受容体はその構造中に二カ所の転写促進領域を持っており、N末端側のものはAF-1領域、C末端側のものはAF-2領域と呼ばれている。AF-2領域はリガンドに依存した転写促進に関与しているとされることから (Mangelsdorfら、Cell、第83巻、第841-850頁、1995年)、これまでに多くの研究がなされ、アゴニストの探索等にも利用してきた。一方、AF-1領域に関してはリガンドに非依存的な転写促進に関与しているという他に多くの知見はない。ところが近年、PPAR γ のAF-1領域に点変異を持つヒトのなかに特徴的な表現型を示すものの存在が報告され、特に第12番目のプロリンがアラニンに変異しているヒトは、野生型に比べて肥満に抵抗性であり良好なインスリン感受性を示すことが報告された（非特許文献4参照）。

PPAR γ の転写誘導活性には他の核内受容体同様に転写共役因子群との相互作用が必要であり、PPAR γ と相互作用する因子を同定しようとする試みがなされてきた。実際に、既存の核内受容体相互作用因子とPPAR γ との結合が調べられており、SRC-1 (Zhuら Gene Expr. 第6巻、第185-195頁、1996年)、CBP/p300 (Gelmanら、J. Biol. Chem.、第274巻、第7681-7688頁、1999年) など複数の分子がPPAR γ と相

互作用することが報告されている。しかしながら、これらの共役因子群は主に AF-2領域に結合するものと考えられており、AF-1領域に結合する共役因子として知られているものは現在のところわずかにPGC-2 (Castilloら、EMBO J. 第18巻、第3676-3687頁 1999年) が挙げられるに留まっている。

p68 RNA ヘリケースは、その塩基配列及びアミノ酸配列がデータベースに登録されており (genpept X52104, genpept X15729, genpept BC016027, genpept AF015812) 、上流塩基配列が非特許文献5に記載されている。また、p68 RNA ヘリケースと相同性の高い分子が特許文献1、特許文献2、特許文献3、特許文献4に記載され、創傷治癒に関与することや腫瘍マーカーとして有用であることが記載されている。一方、核内受容体の一つであるエストロゲンレセプター α のAF-1領域に結合する転写誘導共役因子であることが明らかになっている (非特許文献6参照)。さらに近年、p68 RNA ヘリケースが脂肪細胞分化に関与している可能性が示唆されてきた (非特許文献7、非特許文献8参照)。しかし、その詳細な分子メカニズムについては依然不明である。

(特許文献1)

国際公開第02/28999号パンフレット

(特許文献2)

カナダ第2325226号明細書

(特許文献3)

国際公開第01/60860号パンフレット

(特許文献4)

国際公開第01/64707号パンフレット

(非特許文献1)

「ザ・ランセット (The Lancet)」、(米国)、2000年、第355巻、p. 1008-1010

(非特許文献2)

「ダイアビーティーズ・フロンティア (Diabetes Frontier)」、1999年、第10巻、p. 811-818

(非特許文献3)

「ダイアビーティーズ・フロンティア (Diabetes Frontier) 」、1999年、第10卷、p. 819-824

(非特許文献4)

「ネイチャー・ジェネティクス (Nature Genetics) 」、(米国)、1998年、第20卷、p. 284-287.

(非特許文献5)

「ヌクレオティック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research) 」、(英国) 2000年、第28卷、p. 932-939

(非特許文献6)

「モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Molecular and Cellular Biology) 」、(米国)、1999年、第19卷、p. 5363-5372

(非特許文献7)

「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochemical and Biophysical Research Communications) 」、(米国)、2001年、第287卷、p. 435-439

(非特許文献8)

「アニマル・ジェネティクス (Animal Genetics) 」、(英国)、2000年、第31卷、p. 166-170

発明の開示

本発明者らは、PPAR γ のAF-1領域に結合する蛋白質としてp68 RNA ヘリケースを同定し、ヒト脂肪組織中でp68 RNA ヘリケースが発現していることを見出した。さらに、p68 RNA ヘリケースが過剰に発現するとPPAR γ の転写誘導活性が促進することを見出した。次いで、インスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾンがp68 RNA ヘリケースの発現を誘導することを見出し、該蛋白質の発現亢進が糖尿病態改善となることを見出した。また、p68 RNA ヘリケース上流領域の解析により、転写抑制性調節をする領域を見出した。さらに、ピオグリタゾンによるPPAR γ 転

写活性化の作用点は転写抑制性調節の解除ではないことを見出し、このp68 RNA ヘリケース遺伝子の抑制性調節を解除する作用を持つ物質のスクリーニングにより従来のインスリン抵抗性改善薬とは異なるp68 RNA ヘリケースの発現量を亢進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質を検出及び／又はスクリーニングすることができるを見出した。

これらの知見をもとにして、PPAR γ とp68 RNA ヘリケースとの相互作用を促進する、及び／または、p68 RNA ヘリケースの発現を亢進することによりPPAR γ の転写誘導活性を促進しインスリン抵抗性を改善する新しい物質の同定方法およびスクリーニング方法を構築した。PPAR γ の転写誘導活性を促進することによる従来のPPARアゴニストとは異なる新しいタイプのインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング方法及びインスリン抵抗性改善用医薬組成物の製造方法を提供し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、

[1] i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもPPAR γ と相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ii) 配列番号4で表されるPPAR γ 蛋白質の少なくともAF-1領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド、及び、iii) 前記転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、

あるいは、

i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもPPAR γ と相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び ii) 配列番号4で表されるPPAR γ 蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもPPAR γ と相互作用するポリペプチド、及び、b) 配列番号4で表されるPPAR γ 蛋白質を発現している細胞、

- [2] 転写因子が酵母のGAL4蛋白質である [1] 記載の細胞、
- [3] レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である [1] 記載の細胞、
- [4] i) [1] 乃至 [3] に記載の細胞に試験物質を接触させる工程、及び、
ii) レポーター遺伝子の発現を指標として試験物質依存的な相互作用の変化または試験物質依存的なPPAR γ の転写誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、試験物質がPPAR γ の転写誘導活性を促進するか否かを検出する方法、
- [5] i) [1] 乃至 [3] に記載の細胞に試験物質を接触させる工程、 ii)
レポーター遺伝子の発現を指標として試験物質依存的な相互作用の変化または試験物質依存的なPPAR γ の転写誘導活性の変化を分析する工程、及び iii) レポーター活性を亢進する試験物質を選択する工程を含むことを特徴とする、PPAR γ の転写誘導活性を促進する物質をスクリーニングする方法、
- [6] PPAR γ の転写誘導活性を促進する物質がインスリン抵抗性改善薬である
- [5] 記載のスクリーニング方法、
- [7] i) PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースを発現している細胞に試験物質を接触させる工程、及び、 ii) 試験物質依存的なPPAR相互作用p68 RNA ヘリケース発現量の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法、
- [8] i) 配列番号5で表される塩基配列からなるp68 RNA ヘリケースのプロモーター領域と融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞に試験物質を接触させる工程、及び、 ii) レポーター遺伝子の発現を指標として試験物質依存的な転写誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法、
- [9] 請求の範囲5乃至請求の範囲8に記載のスクリーニングする方法を用いてスクリーニングする工程、及び
前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程
を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善用医薬組成物の製造方法
に関する。

特許文献1にp68 RNA ヘリケースと相同性の高い分子が記載され、当該分子が

関与するとして多数の疾患名が挙げられているが、p68 RNA ヘリケースとインスリン抵抗性との関係及び p68 RNA ヘリケースと PPAR γ との関係については記載されていない。特許文献 2 に記載されている p68 RNA ヘリケースと相同性の高い分子は、創傷治癒に関与するとされている。また、特許文献 3 又は特許文献 4 に記載されている p68 RNA ヘリケースと相同性の高い分子は、腫瘍マーカーとして有用であることや種々の癌に関与すると記載されている。何れの特許文献にも p68 RNA ヘリケース又はそれと相同性の高い分子について、インスリン抵抗性との関係及び PPAR γ との関係については記載されていない。

従って、p68 RNA ヘリケースが PPAR γ の AF-1 領域に結合し、その転写誘導共役因子として機能することは本発明者らが見出した新規の知見であり、PPAR γ と p68 RNA ヘリケースとの相互作用を促進する、及び／または、p68 RNA ヘリケースの発現を亢進することにより PPAR γ の転写誘導活性を促進しインスリン抵抗性を改善する新しい物質の同定方法およびスクリーニング方法、インスリン抵抗性改善用医薬組成物の製造方法は本発明者らが初めて行った発明である。

図面の簡単な説明

図 1 は、実施例 2 で行われたルシフェラーゼ活性を示す図である。グラフの縦軸はルシフェラーゼ活性を、横軸は p68 RNA ヘリケース発現ベクター量を示す。

図 2 は、実施例 5 の (3) で行われたルシフェラーゼ活性を示す図である。グラフの縦軸はルシフェラーゼ活性を、横軸はコトランスフェクトしたプラスミドを示す。斜線バーは薬剤非添加、黒色バーは薬剤添加の結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明を詳細に説明する。

[1] 本発明の細胞

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、公知のヒト由来の天然型 p68 RNA ヘリケースである。配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からな

るポリペプチドは、公知のヒト由来の天然型PPAR γ である。

PPAR γ 転写活性試験のための本発明の細胞作成用の、PPAR γ と相互作用するポリペプチドには、

- (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
- (2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもPPAR γ のAF-1領域と相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（以下、機能的等価改変体と称する）；
- (3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、PPAR γ のAF-1領域と相互作用する蛋白質であるポリペプチド（以下、相同ポリペプチドと称する）；

が含まれる。

機能的等価改変体としては、「配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかもPPAR γ のAF-1領域と相互作用する蛋白質であるポリペプチド」、「配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個、好ましくは1～7個、更に好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、PPAR γ のAF-1領域と相互作用する蛋白質であるポリペプチド」が含まれる。

相同ポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、PPAR γ のAF-1領域と相互作用する蛋白質である限り、特に限定されるものではないが、配列番号2で表されるアミノ酸配列に関して、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなることができ、好ましくはPPAR γ のAF-1領域と相互作用する蛋白質である。なお、本明細書における前記「相同性」とは、Clustal program (HigginsとSharp、Gene、第73巻、第237-244頁、1998年；Thompsonら、Nucleic Acid Res.、第22巻、第4673-4680頁、1994年) 検索によりデフォルトで用意されているパラメータを用いて得られた値Identitiesを意味する。前記のパラメータは以下のとおりである。

Pairwise Alignment Parametersとして

K tuple 1

Gap Penalty 3

Window 5

Diagonals Saved 5

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、機能的等価改変体、相同ポリペプチドを総称して「PPAR相互作用p68RNAヘリケース」と称する。

PPAR γ 転写誘導試験のための本発明の細胞作成用の、PPAR γ 蛋白質融合体をコードする遺伝子は、配列番号4で表されるPPAR γ 蛋白質の少なくともAF-1領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードする遺伝子であればよい。PPAR γ のAF-1領域は配列番号3で表される塩基配列の第1番目～第504番目の塩基配列により表される領域である。また、上記DNA結合領域は、いずれの転写因子のDNA結合領域を用いてもよい。「DNA結合領域」は、DNAに結合するために機能する領域であり、応答配列に対するDNA結合能を有するが、単独で転写誘導能を有しないものを示す。

上記の実施態様において、PPAR γ の転写誘導能を検出するために用いられる「転写因子」は、細胞核内で特定のDNA配列に結合する領域を有する真核生物の転写因子であれば限定されない。また転写因子のDNA結合領域は、応答配列に対するDNA結合能は有するが、単独で転写誘導能を有しないものであればよい。このような転写因子としては、例えば、酵母のGAL4蛋白質(Keeganら、Science、第231巻、第699-704頁、1986年、Maら、Cell、第48巻、第847-853頁、1987年)が挙げられる。GAL4転写因子のDNA結合領域および転写誘導領域は、例えばGAL4の場合、N末端側(およそ第1番目から147番目までのアミノ酸を含む領域)に存在する。

「応答配列」は、転写因子のDNA結合領域が結合し得るDNA配列を用いる。遺伝子の上流域からその領域を切り出して用いる、あるいはその配列を化学的に合成して用いてもよい。「応答配列」のより詳しい定義と実例については「分子細胞生物学第4版」(丸山ら訳、東京化学同人社、2001年)に記載されている。

応答配列の下流に配置される「レポーター遺伝子」は、一般に用いられるものであれば特に限定されないが、定量的測定が容易な酵素遺伝子などが好ましい。

例えば、バクテリアトランスポゾン由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (CAT) 、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子 (Luc) 、クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質遺伝子 (GFP) 等があげられる。レポーター遺伝子は、応答配列の下流に機能的に連結される、あるいはプロモーターに応答配列を挿入されているものが用いられる。

PPAR γ 、転写因子の DNA 結合領域、PPAR 相互作用 p68 RNA ヘリケースをコードするポリヌクレオチドは、既知のアミノ酸配列や塩基配列の情報などをもとに設計し合成したプライマーやプローブを用いて、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法やハイブリダイゼーションによるスクリーニングにより、cDNA ライブラリーから単離できる。PPAR 相互作用 p68 RNA ヘリケースは、同じ分子種として同定されるもので、PPAR γ に相互作用して該受容体のリガンド存在下での転写誘導能に影響を与えるものであればいずれの種由来のものであってもよく、例えばヒト (GenBank accession 番号 X15729, X52104 および AF015812) 、マウス (GenBank accession 番号 X65627) 、ヤマネコ (GenBank accession 番号 AF110009) などの哺乳動物由来のものが挙げられる。PPAR γ は、同じ分子種として同定されるもので、核内受容体としての生体内での機能を果たすものであればいずれの種由来のものであってもよく、例えばヒト (GenBank accession 番号 U79012) 、マウス (GenBank accession 番号 U09138) 、ラット (GenBank accession 番号 AB019561) などの哺乳動物由来のものなどが挙げられる。また、PPAR γ には、PPAR γ 1 及び PPAR γ 2 の二種のアイソフォームが存在し、PPAR γ 1 は PPAR γ 2 と比較すると N 末端側の 30 アミノ酸が欠失しているが、その他のアミノ酸配列は全く同じであり、いずれも脂肪組織に発現していることが知られている。

PPAR γ 、転写因子のDNA結合領域、またはPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースをコードするポリヌクレオチドは、例えば次のように得ることができるが、この方法に限らず公知の操作「Molecular Cloning」[Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年] でも得ることができる。

例えば、(1) PCR を用いた方法、(2) 常法の遺伝子工学的手法 (すなわち cDNA ライブラリーで形質転換した形質転換株から所望のアミノ酸を含む形質転換

株を選択する方法) を用いる方法、又は(3) 化学合成法などを挙げることができる。各製造方法については、WO01/34785 に記載されていると同様に実施できる。

PCR を用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1) 蛋白質遺伝子の製造方法 a) 第1製造法に記載された手順により、本明細書記載のポリヌクレオチドを製造することができる。該記載において、「本発明の蛋白質を产生する能力を有するヒト細胞あるいは組織」とは、例えば、ヒト脂肪組織を挙げることができる。ヒト脂肪組織から mRNA を抽出する。次いで、この mRNA をランダムプライマーまたはオリゴ dT プライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い、第一鎖 cDNA を合成することが出来る。得られた第一鎖 cDNA を用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR) に供し、本発明のポリヌクレオチドまたはその一部を得ることができる。より具体的には、例えば実施例1に記載の方法により本発明のポリヌクレオチドを製造することが出来る。

常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1) 蛋白質遺伝子の製造方法 b) 第2製造法に記載された手順により、本明細書の PPAR γ 、転写因子の DNA 結合領域、または PPAR 相互作用 p68 RNA へリケースをコードするポリヌクレオチドを製造することができる。

化学合成法を用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1) 蛋白質遺伝子の製造方法 c) 第3製造法、d) 第4製造法に記載された方法によって、本明細書の PPAR γ 、転写因子の DNA 結合領域、または PPAR 相互作用 p68 RNA へリケースをコードするポリヌクレオチドを製造することができる。

「Molecular Cloning」[Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年] に記載の方法により、これら各領域をコードする DNA を単独、あるいは連結し、適当なプロモーターの下流に連結することで PPAR γ 及び PPAR 相互作用 p68 RNA へリケースの試験細胞内での発現系が構築できる。具体的には上述のように得られたポリヌクレオチドは、適当なベクタープラスミドに組み込み、プラスミドの形で宿主細胞に導入すればよい。これらは、両者が一つのプラスミド上に含まれるよう構成してもよく、あるいは各々別々のプラスミド上に含まれるよう構成してもよい。あるいは、このような構成が染色体 DNA に組み込まれた細胞

を取得してこれを用いてもよい。

応答配列に連結されたレポーター遺伝子も、一般的な遺伝子組換え技術を用いて構築し、この構成をベクタープラスミド中に組込んだ上、得られた組換えプラスミドを宿主細胞中に導入したものを用いる。あるいは、このような構成が染色体DNAに組み込まれた細胞を取得してこれを用いてもよい。

PPAR γ は外部から導入しても良いが、内在性のPPAR γ が豊富に存在する細胞、例えば脂肪由来細胞などを宿主細胞として用いる場合は、上述の構成のうち、PPAR γ を省いて、応答配列に連結されたレポーターとPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースからなる構成のみを導入してもよい。

より具体的には、単離されたポリヌクレオチドを含む断片は、適当なベクタープラスミドに再び組込むことにより、真核生物及び原核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。宿主細胞を形質転換し、遺伝子を発現させる方法は、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」 2) 本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組換え蛋白の製造方法に記載された方法により実施できる。発現ベクターは、所望のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、所望のポリヌクレオチドを挿入することにより得られる発現ベクターを挙げることができる。

本発明の細胞は、例えば、前記発現ベクターにより、所望の宿主細胞をトランسفエクションすることにより得ることができる。より具体的には、例えば、実施例2に記載のように所望のポリヌクレオチドをほ乳類動物細胞用の発現ベクターpcDNA3.1に組み込むことにより、所望の蛋白質の発現ベクターを得ることができ、該発現ベクターを市販のトランسفエクション試薬リポフェクトアミン2000を用いて COS-1 細胞に取り込ませて本発明の形質転換細胞を製造することができる。

上記で得られる所望の形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により所望の蛋白質が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用し

た宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記 COS-1 細胞であれば牛胎児血清 (FBS) 等の血清成分を添加したダルペッコ修飾イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に G418 を加えたものを使用できる。

[2] 本発明の検出及びスクリーニング方法

本発明の、PPAR γ とPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースとの相互作用を促進する、あるいは、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの発現を亢進することによりPPAR γ の転写誘導活性を促進しインスリン抵抗性を改善する新しい物質の同定およびスクリーニング方法を以下に記載する。

本発明の細胞（以下、試験用細胞と称する）を試験物質の存在下で培養し、PPAR γ の転写誘導能に対するPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの促進作用が試験物質により促進されることをレポーター遺伝子の発現により検出し測定することができる。

また、例えば試験物質がPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの発現を促進したり分解を抑制するとき、発現するレポーター活性の増大が観察される。このような物質はPPAR γ 転写誘導活性促進剤として同定される。

これらはいずれも従来のPPARアゴニストとは異なる構造を有し、より強い主作用を持ち副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬として作用することが期待される。

<PPAR γ の転写誘導活性を促進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質を検出及び／又はスクリーニングする方法>

本発明の一つの実施態様としては、（1）i）PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースをコードするポリヌクレオチド、ii）PPAR γ 蛋白質の少なくともAF-1領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド、及び、iii）前記転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、あるいは、

(2) i) PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースをコードするポリヌクレオチド、及び ii) PPAR γ 蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、

a) PPAR相互作用p68 RNA ヘリケース、及び、 b) PPAR γ 蛋白質を発現している細胞（試験用細胞）を用い、これに試験物質を接触させ、レポーター遺伝子の発現を指標として、試験用細胞における試験物質によるPPAR γ の転写活性化能促進作用の変化を検出し、測定することからなるPPAR γ の転写誘導活性を促進する物質及びインスリン抵抗性を改善する物質を選択、スクリーニングする方法が挙げられる。

ワンハイブリッドシステムは、レポーター遺伝子の発現をマーカーとして蛋白-蛋白質間相互作用を検出する方法である。一般に転写因子はDNA結合領域と転写活性化領域という機能の異なる2つの領域を有するが、ワンハイブリッドシステムでは、2種類の蛋白質XとYの相互作用を調べるために、1) 転写因子のDNA結合領域とXからなる融合蛋白質と、2) Yの2種類を同時に培養細胞内で発現させる。蛋白質XとYが相互作用するとこれらが1つの転写複合体を形成し、これが細胞の核内において前記転写因子の応答配列（特異的に結合するDNAの部位）と結合してその下流に配置されたレポーター遺伝子の転写を活性化する。このように2つの蛋白質の相互作用をレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。より具体的にはCastilloらの方法で実施することが出来る

（EMBO J. 第18巻、第3676-3687頁 1999年）。したがって、PPAR γ とPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの相互作用に対する試験物質の作用はレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができ、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースとPPAR γ との相互作用を促進する物質（即ちPPAR γ の転写誘導活性を促進する物質）並びにインスリン抵抗性を改善する物質の検出及び／又はスクリーニングを実施できる。PPAR γ の転写誘導活性を促進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質を検出及び／又はスクリーニングする方法において用いる細胞に発現するPPAR γ が、PPAR γ 全長蛋白質である場合には、好ましくは、アッセイ系にPPAR γ リガンドを添加するとよい。核内受容体は一般にAF-2領域にリガンドが結合して立体構造が変化した結果、AF-1領域およびAF-2領域に転写共役因子がリクルート

されてきて転写の活性化がおこることが報告されているからである。より具体的には、実施例2に記載の方法で前記スクリーニングを実施できる。

PPAR γ 全長領域を用いる際に好ましい添加するPPAR γ リガンドとしては、PPAR γ の転写誘導能を惹起することができるものであればいずれのものであってもよく、例えば1~1000 nM、好ましくは1~100 nM、より好ましくは1~30 nMの最終濃度でPPAR γ の転写誘導能を惹起することができるものが挙げられる。PPAR γ リガンドとしては、例えば、ピオグリタゾンなどのチアゾリジン誘導体 (Lehmannら、J. Biol. Chem.、第270巻、第12953-12956項、1995年) が挙げられる。

PPAR γ とPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの相互作用に対する試験物質の作用を測定することを特徴とする方法の別の実施態様としては、例えば、生化学的に検出する方法がある。このような方法では、例えばRIなどで標識したPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 、プロテインA、 β -ガラクトシダーゼ、マルトースーパインディングプロテイン (MBP) など適当なタグ蛋白質とPPAR γ のAF-1領域からなる融合タンパク質との結合を試験物質の存在下で直接的に検出することで実施できる。より具体的には実施例1に記載の手法により実施できる。

また、別の実施態様としては免疫化学的な方法 (ELISA法) がある。このような方法では、例えば、2種類の蛋白質XとYの相互作用を調べるために、Xをあらかじめ固定しておき、これにYと試験物質を混ぜた後非特異的な結合を除くために適当な方法で洗浄し、さらにYと特異的に抗原抗体反応をする抗体を添加する。固定されたXに結合したYの量は、Yに特異的に反応した抗体量と置き換えて検出することができる。これを利用してことで、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースとPPAR γ との相互作用を促進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質の検出及び/又はスクリーニングを実施できる。

PPAR γ の転写誘導活性を促進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質を検出及び/又はスクリーニングする方法としては、上記記載の方法が挙げられるが、上記態様において用いるPPARは、1) AF-1領域、2) 好ましくはリガンド添加と共にPPAR全長領域のいずれでもよい。

＜PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの発現量の変化を分析する工程を含むインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法＞

i) PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースを発現している細胞に試験物質を接触させる工程、及び、 ii) 試験物質依存的なPPAR相互作用p68 RNA ヘリケース発現量の変化を分析する工程を含むことを特徴とする方法で、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングすることが出来る。

「細胞」としては、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースを発現している細胞ならば何れの細胞でもよく、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケース発現ベクターを上記のように形質転換して得られた細胞でも良い。好ましくは実施例4に記載の培養細胞3T3L1が挙げられる。「PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースを発現している細胞」がp68 RNA ヘリケースを発現しているか否かは、p68 RNA ヘリケースをコードする塩基配列を有する遺伝子あるいはその一部を用いたノーザンプロットティング法、p68 RNA ヘリケースに特異的な抗体を用いたウエスタンプロットティング法などにより特定することができる。PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースを発現している細胞に試験物質を添加又は非添加して一定時間培養させた後細胞を回収する。試験物質依存的なPPAR相互作用p68 RNA ヘリケース発現量の変化は、遺伝子の転写産物であるmRNA、又は、該mRNAによりコードされる蛋白質の量の変化として測定することができ、試験物質非添加の場合と試験物質添加の場合の前記発現量の変化を比較することにより、試験物質依存的なPPAR相互作用p68 RNA ヘリケース発現量の変化を分析することが出来る。前記の回収した細胞からRNAまたは細胞抽出液を得ることが出来る。回収したRNA中のPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースのmRNA量は、例えば、リアルタイムPCR法などにより検出する事が出来る。より具体的には、実施例4に記載の方法により、前記スクリーニングを実施できる。また、回収した細胞抽出液中のPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの蛋白質量は、例えば、免疫化学的な方法（ウエスタンプロットティング法など）により検出することが出来る。このようにして、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの発現量の変化を分析することによりインスリン抵抗性改善薬のスクリーニングを実施できる。

＜PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースプロモーターを利用してインスリン抵抗性改善

薬をスクリーニングする方法>

i) 配列番号 5 で表される塩基配列からなるp68 RNA ヘリケースのプロモーター領域と融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞に試験物質を接触させる工程、及び、 ii) レポーター遺伝子の発現を指標として試験物質依存的な転写誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴として、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングすることができる。

レポーター遺伝子アッセイ（田村ら、転写因子研究法、羊土社、1993年）は、レポーター遺伝子の発現をマーカーとして遺伝子の発現調節を検出する方法である。一般に遺伝子の発現調節はその5' 上流域に存在するプロモーター領域と呼ばれる部分で制御されており、転写段階での遺伝子発現量はこのプロモーターの活性を測定することで推測することができる。試験物質がプロモーターを活性化すれば、プロモーター領域の下流に配置されたレポーター遺伝子の転写を活性化する。このようにプロモーター活性化作用すなわち発現亢進作用をレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。したがって、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースのプロモーター領域を用いたレポーター遺伝子アッセイにより、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの発現調節に対する試験物質の作用はレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。配列番号 5 で表される塩基配列からなるp68 RNA ヘリケースのプロモーター領域と融合された「レポーター遺伝子」は、一般に用いられるものであれば特に限定されないが、定量的測定が容易な酵素遺伝子などが好ましい。例えば、バクテリアトランスポゾン由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (CAT) 、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子 (Luc) 、クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質遺伝子 (GFP) 等があげられる。レポーター遺伝子は、配列番号 5 で表される塩基配列からなるp68 RNA ヘリケースのプロモーター領域と機能的に融合されていればよい。p68 RNA ヘリケースのプロモーター領域と融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞に試験物質を接触した場合と接触しなかった場合のレポーター遺伝子の発現量を比較することにより試験物質依存的な転写誘導活性の変化を分析することができる。上記工程を実施することにより、PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの発現を亢進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質のスクリーニング

を実施できる。具体的には、実施例5に記載の方法により、前記スクリーニングを実施できる。

本発明のスクリーニング法で使用する試験物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、市販の化合物（ペプチドを含む）、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンピナトリアル・ケミスリー技術（Terrettら、J. Steele. *Tetrahedron*、第51巻、第8135—8173頁、1995年）によって得られた化合物群、微生物の培養上清、植物や海洋生物由來の天然成分、動物組織抽出物、あるいは、本発明のスクリーニング法により選択された化合物（ペプチドを含む）を化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を挙げることができる。

[3] インスリン抵抗性改善用医薬組成物の製造方法

本発明には、本発明のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、及び前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善用医薬組成物の製造方法が包含される。

本発明のスクリーニング方法により得られる物質を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体、賦形剤、及び／又はその他の添加剤を用いて調製することができる。

投与としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、又は経口用液剤などによる経口投与、あるいは、静注、筋注、若しくは関節注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、又は経粘膜投与剤などによる非経口投与を挙げることができる。特に胃で消化されるペプチドにあっては、静注等の非経口投与が好ましい。

経口投与のための固体組成物においては、1又はそれ以上の活性物質と、少な
くとも一つの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶
セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、
又はメタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合することができる。前記組成
物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、滑沢剤、崩壊剤、

安定化剤、又は溶解若しくは溶解補助剤などを含有することができる。錠剤又は丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆することができる。

経口のための液体組成物は、例えば、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、又はエリキシル剤を含むことができ、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば、精製水又はエタノールを含むことができる。前記組成物は、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、又は防腐剤を含有することができる。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性若しくは非水性の溶液剤、懸濁剤、又は乳濁剤を含むことができる。水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、希釈剤として、例えば、注射用蒸留水又は生理用食塩水などを含むことができる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤の希釈剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油(例えば、オリーブ油)、アルコール類(例えば、エタノール)、又はポリソルベート80等を含むことができる。前記組成物は、更に湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解若しくは溶解補助剤、又は防腐剤などを含むことができる。前記組成物は、例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化することができる。また、無菌の固体組成物を製造し、使用の際に、無菌水又はその他の無菌用注射用媒体に溶解し、使用することもできる。

投与量は、有効成分すなわち本発明のスクリーニング方法により得られる物質の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、又は性別等を考慮して、適宜決定することができる。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人(体重60kgとして)において、1日につき約0.1~100mg、好ましくは0.1~50mgである。非経口投与の場合、注射剤の形では、1日につき0.01~50mg、好ましくは0.01~10mgである。

実施例

以下、実施例によって本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法(「Molecular

Cloning] Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年、等)に従って実施可能である。また、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って実施可能である。

(実施例 1) PPAR γ AF-1領域結合蛋白質の同定

(1) PPAR γ 遺伝子の単離と動物細胞発現用プラスミドpcDNA-PPAR γ の作製
配列番号 6 及び 7 に示したプライマーを用いて、ヒト脂肪組織cDNAライブラリー(クロンテック社)からPCR法(DNAポリメラーゼ(LA Taq DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、94 °C (5分)の後、94 °C (30秒)、55 °C (30秒)、72 °C (90秒)のサイクルを35回繰り返した後72 °Cで7分加温)によりPPAR γ 2の全長域をコードする1518bp(ベースペア)を含むcDNA断片を取得した。ヒトPPAR γ 2の全長をコードするcDNAを動物細胞発現ベクターpcDNA3.1/V5-His-TOPOベクター(インビトロジェン社)にin vitro 組換えによるTOPOクローニング法(インビトロジェン社)により挿入して動物細胞発現用プラスミドpcDNA-PPAR γ を作製した。

(2) グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質発現用プラスミドpGEX-PPAR γ -AF-1の作製とGST-PPAR γ -AF-1融合蛋白質の発現

配列番号 6 及び 8 に示したプライマーを用いて、実施例 1 の (1) で作製したpcDNA-PPAR γ を鋳型としてPCR法(DNAポリメラーゼ(Taq DNA polymerase; シグマ社)を用い、94 °C (5分)の後、94 °C (30秒)、55 °C (30秒)、72 °C (30秒)のサイクルを25回繰り返した後72 °Cで7分加温)によりPPAR γ のAF-1領域を含む領域をコードする約600bpのcDNA断片を取得した。これを制限酵素(EcoRIおよびNotI; 宝酒造社)処理し、同様に制限酵素処理したpGEX-6P-1(アマシャムバイオサイエンス社)プラスミドに挿入してGST融合タンパク質発現用プラスミドpGEX-PPAR γ -AF-1を作製した。このプラスミドで形質転換した大腸菌を37 °Cで3時間培養した後、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG; ナカライトスク社)を最終濃度2.5 mMで添加して融合蛋白質の発現を誘導し、さらに27 °Cで6時間培養した。その後この大腸菌を回収し、超音波発生装置(201M; クボタ社)により細胞を破碎してGST-PPAR γ -AF-1融合蛋白質を調製した。

(3) GSTプルダウンアッセイ

実施例1の(2)で調製したGST-PPAR γ -AF-1融合蛋白質をゲル(グルタチオンセファロース4B;アマシャムファルマシア社)に結合させた後、このゲルを適当な緩衝液で洗浄して非特異的な蛋白質の結合を除いた。p68 RNAヘリケース発現ベクター、pSG5-p68(Endohら、Mol. Cell. Biol.、第19巻、第5363-5372頁、1999年)を鑄型として、キット添付のプロトコールに従い試験管内発現系

(TNT[®]T7 Quick Coupled Transcription/ Translation System; プロメガ社)と放射ラベルメチオニン(EASYTAG[™]EXPRESS PROTEIN LABELING MIX [³⁵S]-; NENライフサイエンス社)で放射ラベルした全長p68 RNAヘリケース蛋白質を前記のGST-PPAR γ -AF-1融合蛋白質を結合したゲルに混ぜて4°Cで1時間結合反応をさせた後洗浄した。これをドデシル硫酸ナトリウム変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し(SDS-PAGE)、イメージングアナライザー(Typhoon 8600; ファルマシアバイオサイエンス社)により解析した。その結果、PPAR γ のAF-1領域とp68 RNAヘリケースとの結合が確認された。これによりp68 RNAヘリケースがPPAR γ のAF-1領域に結合する因子であることが明らかとなった。

(実施例2) PPAR γ のリガンド存在下での転写誘導能に対するp68 RNAヘリケースの調節作用の検出

上述の結果から、p68 RNAヘリケースはPPAR γ のAF-1領域と相互作用することが示された。そこでp68 RNAヘリケースがPPAR γ の有する転写誘導活性にどのような影響を及ぼすか、培養細胞COS-1を用いたレポーターアッセイで調査した。PPAR γ のリガンドとして作用することが報告されているチアゾリジン誘導体、ピオグリタゾン(pioglitazone、(+)-5-[4-[2-(5-エチル-2-ピリジニル)エトキシ]ベンジル]-2,4-チアゾリジンジオン; 武田薬品工業、特許1853588号)は特許明細書の方法に従って合成した。

(1) PPAR γ の転写誘導能に対するp68 RNAヘリケースの調節作用の検出

培養細胞COS-1細胞は96ウェル培養プレート(旭テクノグラス社)で90%コンフルエントの状態になるまで各ウェル10%牛胎児血清(シグマ社)を含む100 μ lの最少必須培地DMEM(ギブコ社)中で培養した。この細胞にリポフェクション試薬(リポフェクトアミン2000; インビトロジェン社)を用いて、リポフェクション

試薬添付のプロトコールに従い、以下(A)、(B)、(C)、及び(D)を一過性にコトランスフェクトした。

- (A) 実施例1の(1)により作製したpcDNA-PPAR γ (30 ng/ウェル)
- (B) PPAR結合配列をルシフェラーゼ遺伝子の上流に配置したレポーターコンストラクト (Kliewerら、Nature、第358巻、第771-774頁、1992年) (100 ng/ウェル)
- (C) p68 RNA ヘリケース発現ベクター、pSG5-p68 (Endohら、Mol. Cell. Biol.、第19巻、第5363-5372頁、1999年) (0-10 ng/ウェル)
- (D) β -ガラクトシダーゼ発現遺伝子をもつプラスミドpCMV- β -ガラクトシダーゼコントロールベクター (ロッシュ・ダイアグノスティック社) 10 ng/ウェル

PPAR γ アゴニストであるピオグリタゾンを最終濃度30 nMとなるように前記コトランスフェクトした細胞に添加して24時間培養した後、培地を除去し、細胞をリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した。1ウェルあたり80 μ lの細胞溶解液 (100 mM リン酸カリウム (pH7.8)、0.2 %トリトンX-100) を添加して細胞を溶解した。この細胞溶解液20 μ lにルシフェラーゼ基質溶液100 μ l (和光純薬工業社) を添加し、化学発光測定装置 (ML3000型；ダイナテックラボラトリーズ社) を用いて発光量を測定した。また、別途、前記細胞溶解液の β -ガラクトシダーゼ活性を β -ガラクトシダーゼ活性検出キット (Galacto-Light PlusTM system；TROPIX社) を用いて測定し数値化した。これを導入遺伝子のトランスフェクション効率として上述のルシフェラーゼ活性を各ウェル毎に補正した。

上記実験の結果、PPAR γ のアゴニスト依存的な転写誘導活性は、p68 RNA ヘリケースを共発現することにより、p68RNAヘリケース量依存的に促進されることがわかった (図1)。この事実は、p68RNAヘリケースがPPAR γ の転写誘導共役因子の一つであることを明らかにしている。これをを利用して、p68RNAヘリケースの量を増やせば、生体のエネルギー源を糖代謝へ向かわせ血糖値を降下させることが可能である。すなわち、p68RNAヘリケースの量が増えることでPPAR γ の転写誘導能がより亢進する結果、PPAR γ アゴニスト同様の作用、つまりインスリン抵抗性改善作用を期待することが出来る。本実験系で、PPAR γ の転写誘導活性を促進す

る物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質の検出及び／又はスクリーニングが可能となった。

（実施例3）ヒト組織におけるp68 RNA ヘリケースの発現確認

配列番号9及び10に示したプライマーを用いて、ヒトcDNAライブラリー（クロンテック社）からPCR法（DNAポリメラーゼ（Taq DNA polymerase；シグマ社）を用い、94 °C（5分）の後、94 °C（30秒）、55°C（30秒）、72°C（30秒）のサイクルを35回繰り返し、72 °Cで7分加温）によりp68 RNA ヘリケースをコードする約800bpのcDNA断片の増幅をアガロースゲル電気泳動法により検出した。その結果、p68 RNA ヘリケースは、PPAR γ の作用があることが知られている脂肪組織及び筋肉で発現していることを見出した。これにより発現部位からもp68 RNA ヘリケースがPPAR γ の転写共役因子であることが裏付けられた。

（実施例4）3T3L1細胞の脂肪細胞への分化過程におけるp68 RNA ヘリケースmRNA発現量の比較

培養細胞3T3L1細胞は培養プレート（直径60 mm；旭テクノグラス社）に10 %牛胎児血清（シグマ社）を含む最少必須培地DMEM（ギブコ社）2 mlを加えてコンフルエントの状態になるまで培養した。その後、分化用培地（最少必須培地DMEM（ギブコ社）にインスリン（最終濃度10 μ g/ml；シグマ社）、デキサメサゾン（最終濃度250 μ M；シグマ社）および3-イソブチル-1-メトキシルキサンチン（最終濃度500 μ M；シグマ社）を加えたもの）に交換し、これにインスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾン（最終濃度1 μ M）を添加したものと添加しなかったものとでp68 RNA ヘリケースの発現量に変化が生じるか否かを調査した。ピオグリタゾンを添加して24時間後に細胞を回収し、RNA抽出試薬（ISOGEN；和光純薬工業社）を用いてRNAを抽出して逆転写反応キット（Thermoscript RT-PCR System；インビトロジェン社）を使って逆転写反応を行ったものを鑄型として、配列番号11及び12（p68 RNA ヘリケース）、もしくは配列番号13及び14（G3PDH）に示したプライマーセットと検出試薬（2x SYBR Green Master Mix；アプライドバイオシステム社）を用いてリアルタイムPCR法（プリズム7700シ

クエンスディテクションシステム；アプライドバイオシステム社)によりp68 RNA ヘリケース及びG3PDHの発現量の変化を調べた。p68 RNA ヘリケース遺伝子の発現量は、下記式に基づいてG3PDH遺伝子の発現量で補正した。

[p68 RNA ヘリケース補正発現量]=[p68 RNA ヘリケースの発現量(生データ)]/[G3PDH遺伝子の発現量(生データ)]

その結果、ピオグリタゾンを添加したものは非添加のものに比較してp68 RNA ヘリケースの発現量が約1.7倍となっていることが明らかとなった。これによりインスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾンは、p68 RNA ヘリケースの発現量を亢進させる作用を有しており、したがって、p68 RNA ヘリケースの発現亢進が、インスリン抵抗性を改善することが裏付けられた。

(実施例5) p68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター活性の検出

(1) p68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター領域の単離とレポーターベクターの作製

先に報告されているp68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーターの塩基配列 (Rösslerら、Nucleic Acids Res.、第28巻、第932-939頁、2000年) およびヒトゲノムDNA配列 (GenBank accession 番号AC009994) を基に設計した配列番号14及び15のプライマーを用いてヒトゲノムDNA (クロンテック社) を鋳型として、PCR法 (DNAポリメラーゼ (LA Taq DNA polymerase; 宝酒造社) を用い、98 °C (5分) の後、96 °C (30秒) 、55 °C (30秒) 、72 °C (90秒) のサイクルを35回繰り返した後72 °Cで7分加温) によりp68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター領域を含む配列番号5で示されるDNA断片を取得した。このDNA断片を制限酵素 (KpnI およびXhol; 宝酒造社) で処理し、同様に制限酵素処理したルシフェラーゼレポーターベクター (pGL3-Basicベクター; プロメガ社) に連結してp68 RNA ヘリケース遺伝子プロモーター連結レポーターベクター (pGL3-p68-1184bp) を構築した。さらに、このpGL3-p68-1184bpを制限酵素 (NheI およびXhol; 宝酒造社) で処理して得られたp68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター領域を-899bpまで含んだDNA断片を、同様に制限酵素処理したpGL3-Basicベクターに連結し、p68 RNA ヘリケース遺伝子プロモーター連結レポーターベクター

(pGL3-p68-899bp) を構築した。

(2) p68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター活性の検出

実施例5の(1)で構築したpGL3-p68-899bp、pGL3-p68-1184bp、又は陰性対照としてpGL3-Basic (100 ng/ウェル) をそれぞれ β -ガラクトシダーゼ発現ベクター (pCMV- β -ガラクトシダーゼコントロールベクター；ロッシュ・ダイアグノスティック社社) (10 ng/ウェル) と共にCOS-1細胞に一過性にコトランスクエクトした。コトランスクエクトは実施例2の(1)と同様の方法で行った。48時間培養した後、実施例2と同様にルシフェラーゼ発光量を測定した。また、実施例2と同様に β -ガラクトシダーゼ活性を測定してこれを導入遺伝子のトランスクエクション効率として上述のルシフェラーゼ活性を各ウェル毎に補正した。

上記実験の結果、p68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター活性は陰性対照であるpGL3-Basicに比して非常に強いことが明らかとなった (pGL3-p68-1184bpの時pGL3-Basicの約202倍、pGL3-p68-899bpの時pGL3-Basicの約94倍)。またpGL3-p68-899bpに比してpGL3-p68-1184bpで得られた活性が約半分であったことから、-1184bpから-899bpまでの領域が転写抑制性調節に関与していることが明らかとなった。この抑制性調節を解除する作用をもつ物質は、結果としてp68 RNA ヘリケース遺伝子の転写を亢進する作用があると期待され、pGL3-p68-1184bpを用いた本発明によりこのような物質をスクリーニングすることが可能となった。

(3) p68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター活性に対するインスリン抵抗性改善薬の調節作用の検出

インスリン抵抗性改善薬の一つであるピオグリタゾンを最終濃度10 μ Mとなるように実施例5の(2)でコトランスクエクトした細胞に添加して24時間培養した後、実施例2と同様にルシフェラーゼ活性を測定した。また、実施例2と同様に β -ガラクトシダーゼ活性を測定してこれを導入遺伝子のトランスクエクション効率として上述のルシフェラーゼ活性を各ウェル毎に補正した。

上記実験の結果、インスリン抵抗性改善薬依存的にp68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター活性の亢進が認められた(図2)。この事実は、p68 RNA ヘリケース遺伝子の転写がインスリン抵抗性改善薬の一つであるピオグリタゾンによって亢進されることを明らかにし、インスリン抵抗性改善の機構がp68 RNA ヘリケ

ース遺伝子の転写活性化であることを明らかにしている。

また、インスリン抵抗性改善薬の一つであるピオグリタゾンによるp68 RNA ヘリケース遺伝子のプロモーター活性の亢進はpGL3-p68-899bpおよびpGL3-p68-1184bpの両方で同様に認められたことから、ピオグリタゾンによる転写活性化の作用点は-899bpより3' 下流側に存在すると考えられ、-1184bpから-899bpまでの領域による転写抑制性調節の解除ではないことが明らかとなった。したがって、このp68 RNA ヘリケース遺伝子の抑制性調節を解除する作用を持つ物質のスクリーニング、より具体的にはpGL3-p68-1184bpのレポーター活性をより亢進させる物質のスクリーニングにより従来のインスリン抵抗性改善薬とは異なるp68 RNA ヘリケースの発現量を亢進する物質並びにインスリン抵抗性を改善する物質を検出及び／又はスクリーニングすることが可能になった。

これらのことより、p68 RNA ヘリケースの発現亢進がインスリン抵抗性を改善する可能性が裏付けられた。これをを利用して、p68 RNA ヘリケースの発現量を亢進させれば、生体のエネルギー源を糖代謝へ向かわせ血糖値を降下させることが可能である。本実験系でインスリン抵抗性を改善する物質の検出及び／又はスクリーニングが可能となった。

産業上の利用可能性

本発明の、PPAR γ とPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの相互作用を利用したスクリーニング系、及びPPAR相互作用p68 RNA ヘリケースの発現亢進を利用したスクリーニング系は、従来のインスリン抵抗性改善薬であるPPAR γ 合成リガンドとは異なる新しいタイプの薬剤のスクリーニングに利用できる。本発明の細胞は、前記スクリーニング系の構築に利用できる。

また、本発明のスクリーニング方法により得ることができる物質を有効成分とし、担体、賦形剤、及び／又はその他の添加剤を用いて製剤化することにより、インスリン抵抗性改善用医薬組成物を製造することができる。

配列表フリーテキスト

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号 6~8、10、14、及び 15 の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請求の範囲

1. i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもPPAR γ と相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ii) 配列番号4で表されるPPAR γ 蛋白質の少なくともAF-1領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードするポリヌクレオチド、及び、iii) 前記転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、

あるいは、

i) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもPPAR γ と相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びii) 配列番号4で表されるPPAR γ 蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質において、1~10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもPPAR γ と相互作用するポリペプチド、及び、b) 配列番号4で表されるPPAR γ 蛋白質を発現している細胞。

2. 転写因子が酵母のGAL4蛋白質である請求の範囲1記載の細胞。
3. レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求の範囲1記載の細胞。
4. i) 請求の範囲1乃至請求の範囲3に記載の細胞に試験物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として試験物質依存的な相互作用の変化または試験物質依存的なPPAR γ の転写誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、試験物質がPPAR γ の転写誘導活性を促進するか否かを検出する方法。
5. i) 請求の範囲1乃至請求の範囲3に記載の細胞に試験物質を接触させる工程、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として試験物質依存的な相互作用の変化または試験物質依存的なPPAR γ の転写誘導活性の変化を分析する工程、及びiii) レポーター活性を亢進する試験物質を選択する工程を含むことを特徴とする、

PPAR γ の転写誘導活性を促進する物質をスクリーニングする方法。

6. PPAR γ の転写誘導活性を促進する物質がインスリン抵抗性改善薬である請求の範囲5記載のスクリーニング方法。

7. i) PPAR相互作用p68 RNA ヘリケースを発現している細胞に試験物質を接触させる工程、及び、 ii) 試験物質依存的なPPAR相互作用p68 RNA ヘリケース発現量の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法。

8. i) 配列番号5で表される塩基配列からなるp68 RNA ヘリケースのプロモーター領域と融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞に試験物質を接触させる工程、及び、 ii) レポーター遺伝子の発現を指標として試験物質依存的な転写誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法。

9. 請求の範囲5乃至請求の範囲8に記載のスクリーニングする方法を用いてスクリーニングする工程、及び
前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程
を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善用医薬組成物の製造方法。

1/1

Fig1.

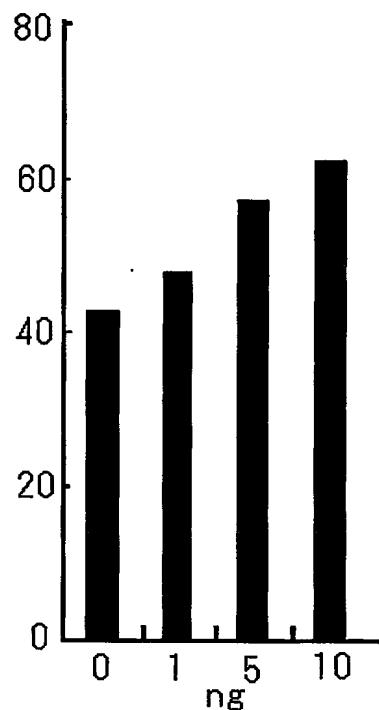
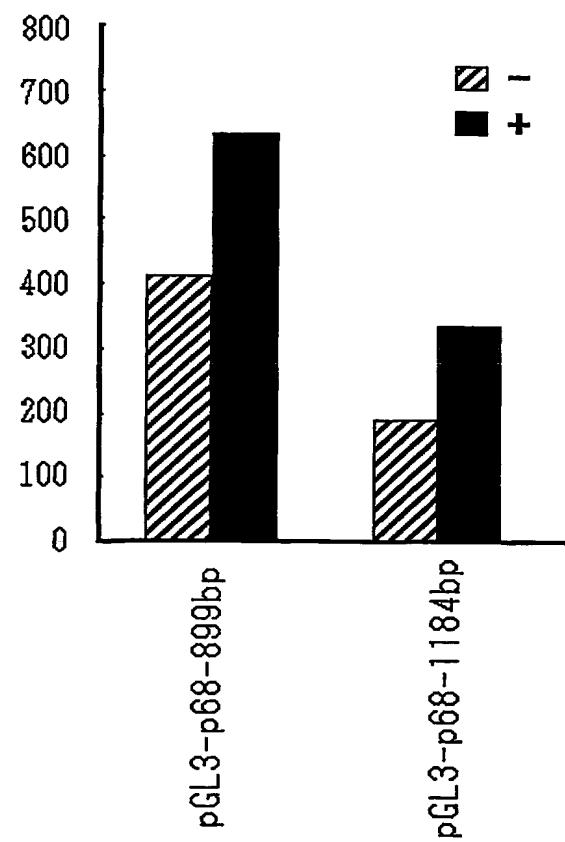


Fig2.



SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co.,Ltd.

<120> A screening method for detecting PPAR modulators using p68 RNA helicase

<130> Y0329-PCT

<150> JP2002-193814

<151> 2002-07-02

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1845

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1845)

<223> Inventor: Ogino, Makoto, Endoh, Hideki

<400> 1

atg tcg ggt tat tcg agt gac cga gac cgc ggc cgg gac cga ggg ttt 48

Met Ser Gly Tyr Ser Ser Asp Arg Asp Arg Gly Arg Asp Arg Gly Phe

1 5 10 15

ggt gca cct cga ttt gga gga agt agg gca ggg ccc tta tct gga aag 96

Gly Ala Pro Arg Phe Gly Gly Ser Arg Ala Gly Pro Leu Ser Gly Lys

20 25 30

2/23

aag ttt gga aac cct ggg gag aaa tta gtt aaa aag aag tgg aat ctt	144
Lys Phe Gly Asn Pro Gly Glu Lys Leu Val Lys Lys Trp Asn Leu	
35 40 45	
gat gag ctg cct aaa ttt gag aag aat ttt tat caa gag cac cct gat	192
Asp Glu Leu Pro Lys Phe Glu Lys Asn Phe Tyr Gln Glu His Pro Asp	
50 55 60	
ttg gct agg cgc aca gca caa gag gtg gaa aca tac aga aga agc aag	240
Leu Ala Arg Arg Thr Ala Gln Glu Val Glu Thr Tyr Arg Arg Ser Lys	
65 70 75 80	
gaa att aca gtt aga ggt cac aac tgc ccg aag cca gtt cta aat ttt	288
Glu Ile Thr Val Arg Gly His Asn Cys Pro Lys Pro Val Leu Asn Phe	
85 90 95	
tat gaa gcc aat ttc cct gca aat gtc atg gat gtt att gca aga cag	336
Tyr Glu Ala Asn Phe Pro Ala Asn Val Met Asp Val Ile Ala Arg Gln	
100 105 110	
aat ttc act gaa ccc act gct att caa gct cag gga tgg cca gtt gct	384
Asn Phe Thr Glu Pro Thr Ala Ile Gln Ala Gln Gly Trp Pro Val Ala	
115 120 125	
cta agt gga ttg gat atg gtt gga gtg gca cag act gga tct ggg aaa	432
Leu Ser Gly Leu Asp Met Val Gly Val Ala Gln Thr Gly Ser Gly Lys	
130 135 140	
aca ttg tct tat ttg ctt cct gcc att gtc cac atc aat cat cag cca	480
Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile Asn His Gln Pro	
145 150 155 160	
ttc cta gag aga ggc gat ggg cct att tgt ttg gtg ctg gca cca act	528
Phe Leu Glu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Cys Leu Val Leu Ala Pro Thr	
165 170 175	

3/23

cgg gaa ctg gcc caa cag gtg cag caa gta gct gct gaa tat tgt aga	576	
Arg Glu Leu Ala Gln Gln Val Gln Gln Val Ala Ala Glu Tyr Cys Arg		
180	185	190
gca tgt cgc ttg aag tct act tgt atc tac ggt ggt gct cct aag gga	624	
Ala Cys Arg Leu Lys Ser Thr Cys Ile Tyr Gly Gly Ala Pro Lys Gly		
195	200	205
cca caa ata cgt gat ttg gag aga ggt gtg gaa atc tgt att gca aca	672	
Pro Gln Ile Arg Asp Leu Glu Arg Gly Val Glu Ile Cys Ile Ala Thr		
210	215	220
cct gga aga ctg att gac ttt tta gag tgt gga aaa acc aat ctg aga	720	
Pro Gly Arg Leu Ile Asp Phe Leu Glu Cys Gly Lys Thr Asn Leu Arg		
225	230	235
240		
aga aca acc tac ctt gtc ctt gat gaa gca gat aga atg ctt gat atg	768	
Arg Thr Thr Tyr Leu Val Leu Asp Glu Ala Asp Arg Met Leu Asp Met		
245	250	255
ggc ttt gaa ccc caa ata agg aag att gtg gat caa ata aga cct gat	816	
Gly Phe Glu Pro Gln Ile Arg Lys Ile Val Asp Gln Ile Arg Pro Asp		
260	265	270
agg caa act cta atg tgg agt gcg act tgg cca aaa gaa gta aga cag	864	
Arg Gln Thr Leu Met Trp Ser Ala Thr Trp Pro Lys Glu Val Arg Gln		
275	280	285
ctt gct gaa gat ttc ctg aaa gac tat att cat ata aac att ggt gca	912	
Leu Ala Glu Asp Phe Leu Lys Asp Tyr Ile His Ile Asn Ile Gly Ala		
290	295	300
ctt gaa ctg agt gca aac cac aac att ctt cag att gtg gat gtg tgt	960	
Leu Glu Leu Ser Ala Asn His Asn Ile Leu Gln Ile Val Asp Val Cys		
305	310	315
320		

4/23

cat gac gta gaa aag gat gaa aaa ctt att cgt cta atg gaa gag atc 1008
His Asp Val Glu Lys Asp Glu Lys Leu Ile Arg Leu Met Glu Glu Ile
325 330 335

atg agt gag aag gag aat aaa acc att gtt ttt gtg gaa acc aaa aga 1056
Met Ser Glu Lys Glu Asn Lys Thr Ile Val Phe Val Glu Thr Lys Arg
340 345 350

aga tgt gat gag ctt acc aga aaa atg agg aga gat ggg tgg cct gcc 1104
Arg Cys Asp Glu Leu Thr Arg Lys Met Arg Arg Asp Gly Trp Pro Ala
355 360 365

atg ggt atc cat ggt gac aag agt caa caa gag cgt gac tgg gtt cta 1152
Met Gly Ile His Gly Asp Lys Ser Gln Gln Glu Arg Asp Trp Val Leu
370 375 380

aat gaa ttc aaa cat gga aaa gct cct att ctg att gct aca gat gtg 1200
Asn Glu Phe Lys His Gly Lys Ala Pro Ile Leu Ile Ala Thr Asp Val
385 390 395 400

gcc tcc aga ggg cta gat gtg gaa gat gtg aaa ttt gtc atc aat tat 1248
Ala Ser Arg Gly Leu Asp Val Glu Asp Val Lys Phe Val Ile Asn Tyr
405 410 415

gac tac cct aac tcc tca gag gat tat att cat cga att gga aga act 1296
Asp Tyr Pro Asn Ser Ser Glu Asp Tyr Ile His Arg Ile Gly Arg Thr
420 425 430

gct cgc agt acc aaa aca ggc aca gca tac act ttc ttt aca cct aat 1344
Ala Arg Ser Thr Lys Thr Gly Thr Ala Tyr Thr Phe Phe Thr Pro Asn
435 440 445

aac ata aag caa gtg agc gac ctt atc tct gtg ctt cgt gaa gct aat 1392
Asn Ile Lys Gln Val Ser Asp Leu Ile Ser Val Leu Arg Glu Ala Asn
450 455 460

5/23

caa gca att aat ccc aag ttg ctt cag ttg gtc gaa gac aga ggt tca Gln Ala Ile Asn Pro Lys Leu Leu Gln Leu Val Glu Asp Arg Gly Ser	465	470	475	480	1440
ggt cgt tcc agg ggt aga gga ggc atg aag gat gac cgt cgg gac aga Gly Arg Ser Arg Gly Arg Gly Gly Met Lys Asp Asp Arg Arg Asp Arg	485	490	495		1488
tac tct gcg ggc aaa agg ggt gga ttt aat acc ttt aga gac agg gaa Tyr Ser Ala Gly Lys Arg Gly Gly Phe Asn Thr Phe Arg Asp Arg Glu	500	505	510		1536
aat tat gac aga ggt tac tct agc ctg ctt aaa aga gat ttt ggg gca Asn Tyr Asp Arg Gly Tyr Ser Ser Leu Leu Lys Arg Asp Phe Gly Ala	515	520	525		1584
aaa act cag aat ggt gtt tac agt gct gca aat tac acc aat ggg agc Lys Thr Gln Asn Gly Val Tyr Ser Ala Ala Asn Tyr Thr Asn Gly Ser	530	535	540		1632
ttt gga agt aat ttt gtg tct gct ggt ata cag acc agt ttt agg act Phe Gly Ser Asn Phe Val Ser Ala Gly Ile Gln Thr Ser Phe Arg Thr	545	550	555	560	1680
ggt aat cca aca ggg act tac cag aat ggt tat gat agc act cag caa Gly Asn Pro Thr Gly Thr Tyr Gln Asn Gly Tyr Asp Ser Thr Gln Gln	565	570	575		1728
tac gga agt aat gtt cca aat atg cac aat ggt atg aac caa cag gca Tyr Gly Ser Asn Val Pro Asn Met His Asn Gly Met Asn Gln Gln Ala	580	585	590		1776
tat gca tat cct gct act gca gct gca cct atg att ggt tat cca atg Tyr Ala Tyr Pro Ala Thr Ala Ala Ala Pro Met Ile Gly Tyr Pro Met	595	600	605		1824

6/23

cca aca gga tat tcc caa taa 1845
Pro Thr Gly Tyr Ser Gln
610

<210> 2
<211> 614
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Gly Tyr Ser Ser Asp Arg Asp Arg Gly Arg Asp Arg Gly Phe
1 5 10 15

Gly Ala Pro Arg Phe Gly Gly Ser Arg Ala Gly Pro Leu Ser Gly Lys
20 25 30

Lys Phe Gly Asn Pro Gly Glu Lys Leu Val Lys Lys Lys Trp Asn Leu
35 40 45

Asp Glu Leu Pro Lys Phe Glu Lys Asn Phe Tyr Gln Glu His Pro Asp
50 55 60

Leu Ala Arg Arg Thr Ala Gln Glu Val Glu Thr Tyr Arg Arg Ser Lys
65 70 75 80

Glu Ile Thr Val Arg Gly His Asn Cys Pro Lys Pro Val Leu Asn Phe
85 90 95

7/23

Tyr Glu Ala Asn Phe Pro Ala Asn Val Met Asp Val Ile Ala Arg Gln
100 105 110

Asn Phe Thr Glu Pro Thr Ala Ile Gln Ala Gln Gly Trp Pro Val Ala
115 120 125

Leu Ser Gly Leu Asp Met Val Gly Val Ala Gln Thr Gly Ser Gly Lys
130 135 140

Thr Leu Ser Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Val His Ile Asn His Gln Pro
145 150 155 160

Phe Leu Glu Arg Gly Asp Gly Pro Ile Cys Leu Val Leu Ala Pro Thr
165 170 175

Arg Glu Leu Ala Gln Gln Val Gln Val Ala Ala Glu Tyr Cys Arg
180 185 190

Ala Cys Arg Leu Lys Ser Thr Cys Ile Tyr Gly Gly Ala Pro Lys Gly
195 200 205

Pro Gln Ile Arg Asp Leu Glu Arg Gly Val Glu Ile Cys Ile Ala Thr
210 215 220

Pro Gly Arg Leu Ile Asp Phe Leu Glu Cys Gly Lys Thr Asn Leu Arg
225 230 235 240

8/23

Arg Thr Thr Tyr Leu Val Leu Asp Glu Ala Asp Arg Met Leu Asp Met
245 250 255

Gly Phe Glu Pro Gln Ile Arg Lys Ile Val Asp Gln Ile Arg Pro Asp
260 265 270

Arg Gln Thr Leu Met Trp Ser Ala Thr Trp Pro Lys Glu Val Arg Gln
275 280 285

Leu Ala Glu Asp Phe Leu Lys Asp Tyr Ile His Ile Asn Ile Gly Ala
290 295 300

Leu Glu Leu Ser Ala Asn His Asn Ile Leu Gln Ile Val Asp Val Cys
305 310 315 320

His Asp Val Glu Lys Asp Glu Lys Leu Ile Arg Leu Met Glu Glu Ile
325 330 335

Met Ser Glu Lys Glu Asn Lys Thr Ile Val Phe Val Glu Thr Lys Arg
340 345 350

Arg Cys Asp Glu Leu Thr Arg Lys Met Arg Arg Asp Gly Trp Pro Ala
355 360 365

Met Gly Ile His Gly Asp Lys Ser Gln Gln Glu Arg Asp Trp Val Leu
370 375 380

9/23

Asn Glu Phe Lys His Gly Lys Ala Pro Ile Leu Ile Ala Thr Asp Val
385 390 395 400

Ala Ser Arg Gly Leu Asp Val Glu Asp Val Lys Phe Val Ile Asn Tyr
405 410 415

Asp Tyr Pro Asn Ser Ser Glu Asp Tyr Ile His Arg Ile Gly Arg Thr
420 425 430

Ala Arg Ser Thr Lys Thr Gly Thr Ala Tyr Thr Phe Phe Thr Pro Asn
435 440 445

Asn Ile Lys Gln Val Ser Asp Leu Ile Ser Val Leu Arg Glu Ala Asn
450 455 460

Gln Ala Ile Asn Pro Lys Leu Leu Gln Leu Val Glu Asp Arg Gly Ser
465 470 475 480

Gly Arg Ser Arg Gly Arg Gly Gly Met Lys Asp Asp Arg Arg Asp Arg
485 490 495

Tyr Ser Ala Gly Lys Arg Gly Gly Phe Asn Thr Phe Arg Asp Arg Glu
500 505 510

Asn Tyr Asp Arg Gly Tyr Ser Ser Leu Leu Lys Arg Asp Phe Gly Ala
515 520 525

10/23

Lys Thr Gln Asn Gly Val Tyr Ser Ala Ala Asn Tyr Thr Asn Gly Ser
530 535 540

Phe Gly Ser Asn Phe Val Ser Ala Gly Ile Gln Thr Ser Phe Arg Thr
545 550 555 560

Gly Asn Pro Thr Gly Thr Tyr Gln Asn Gly Tyr Asp Ser Thr Gln Gln
565 570 575

Tyr Gly Ser Asn Val Pro Asn Met His Asn Gly Met Asn Gln Gln Ala
580 585 590

Tyr Ala Tyr Pro Ala Thr Ala Ala Pro Met Ile Gly Tyr Pro Met
595 600 605

Pro Thr Gly Tyr Ser Gln
610

<210> 3
<211> 1518
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1518)
<223>

<400> 3
atg ggt gaa act ctg gga gat tct cct att gac cca gaa agc gat tcc 48

11/23

Met Gly Glu Thr Leu Gly Asp Ser Pro Ile Asp Pro Glu Ser Asp Ser
 1 5 10 15

ttc act gat aca ctg tct gca aac ata tca caa gaa atg acc acc atg gtt 96
 Phe Thr Asp Thr Leu Ser Ala Asn Ile Ser Gln Glu Met Thr Met Val
 20 25 30

gac aca gag atg cca ttc tgg ccc acc aac ttt ggg atc agc tcc gtg 144
 Asp Thr Glu Met Pro Phe Trp Pro Thr Asn Phe Gly Ile Ser Ser Val
 35 40 45

gat ctc tcc gta atg gaa gac cac tcc cac tcc ttt gat atc aag ccc 192
 Asp Leu Ser Val Met Glu Asp His Ser His Ser Phe Asp Ile Lys Pro
 50 55 60

ttc act act gtt gac ttc tcc agc att tct act cca cat tac gaa gac 240
 Phe Thr Thr Val Asp Phe Ser Ser Ile Ser Thr Pro His Tyr Glu Asp
 65 70 75 80

att cca ttc aca aga aca gat cca gtg gtt gca gat tac aag tat gac 288
 Ile Pro Phe Thr Arg Thr Asp Pro Val Val Ala Asp Tyr Lys Tyr Asp
 85 90 95

ctg aaa ctt caa gag tac caa agt gca atc aaa gtg gag cct gca tct 336
 Leu Lys Leu Gln Glu Tyr Gln Ser Ala Ile Lys Val Glu Pro Ala Ser
 100 105 110

cca cct tat tat tct gag aag act cag ctc tac aat aag cct cat gaa 384
 Pro Pro Tyr Tyr Ser Glu Lys Thr Gln Leu Tyr Asn Lys Pro His Glu
 115 120 125

gag cct tcc aac tcc ctc atg gca att gaa tgt cgt gtc tgt gga gat 432
 Glu Pro Ser Asn Ser Leu Met Ala Ile Glu Cys Arg Val Cys Gly Asp
 130 135 140

aaa gct tct gga ttt cac tat gga gtt cat gct tgt gaa gga tgc aag 480

12/23

Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys
145 150 155 160

ggt ttc ttc cgg aga aca atc aga ttg aag ctt atc tat gac aga tgt 528
Gly Phe Phe Arg Arg Thr Ile Arg Leu Lys Leu Ile Tyr Asp Arg Cys
165 170 175

gat ctt aac tgt cgg atc cac aaa aaa agt aga aat aaa tgt cag tac 576
Asp Leu Asn Cys Arg Ile His Lys Lys Ser Arg Asn Lys Cys Gln Tyr
180 185 190

tgt cgg ttt cag aaa tgc ctt gca gtg ggg atg tct cat aat gcc atc 624
Cys Arg Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Ser His Asn Ala Ile
195 200 205

agg ttt ggg cgg atg cca cag gcc gag aag gag aag ctg ttg gcg gag 672
Arg Phe Gly Arg Met Pro Gln Ala Glu Lys Glu Lys Leu Leu Ala Glu
210 215 220

atc tcc agt gat atc gac cag ctg aat cca gag tcc gct gac ctc cgg 720
Ile Ser Ser Asp Ile Asp Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ala Asp Leu Arg
225 230 235 240

gcc ctg gca aaa cat ttg tat gac tca tac ata aag tcc ttc ccg ctg 768
Ala Leu Ala Lys His Leu Tyr Asp Ser Tyr Ile Lys Ser Phe Pro Leu
245 250 255

acc aaa gca aag gcg agg gcg atc ttg aca gga aag aca aca gac aaa 816
Thr Lys Ala Lys Ala Arg Ala Ile Leu Thr Gly Lys Thr Thr Asp Lys
260 265 270

tca cca ttc gtt atc tat gac atg aat tcc tta atg atg gga gaa gat 864
Ser Pro Phe Val Ile Tyr Asp Met Asn Ser Leu Met Met Gly Glu Asp
275 280 285

aaa atc aag ttc aaa cac atc acc ccc ctg cag gag cag agc aaa gag 912

13/23

Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu Gln Glu Gln Ser Lys Glu
 290 295 300

gtg gcc atc cgc atc ttt cag ggc tgc cag ttt cgc tcc gtg gag gct 960
 Val Ala Ile Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln Phe Arg Ser Val Glu Ala
 305 310 315 320

gtg cag gag atc aca gag tat gcc aaa agc att cct ggt ttt gta aat 1008
 Val Gln Glu Ile Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Ile Pro Gly Phe Val Asn
 325 330 335

ctt gac ttg aac gac caa gta act ctc ctc aaa tat gga gtc cac gag 1056
 Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val His Glu
 340 345 350

atc att tac aca atg ctg gcc tcc ttg atg aat aaa gat ggg gtt ctc 1104
 Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met Asn Lys Asp Gly Val Leu
 355 360 365

ata tcc gag ggc caa ggc ttc atg aca agg gag ttt cta aag agc ctg 1152
 Ile Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu
 370 375 380

cga aag cct ttt ggt gac ttt atg gag ccc aag ttt gag ttt gct gtg 1200
 Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe Met Glu Pro Lys Phe Glu Phe Ala Val
 385 390 395 400

aag ttc aat gca ctg gaa tta gat gac agc gac ttg gca ata ttt att 1248
 Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Asp Leu Ala Ile Phe Ile
 405 410 415

gct gtc att att ctc agt gga gac cgc cca ggt ttg ctg aat gtg aag 1296
 Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Lys
 420 425 430

ccc att gaa gac att caa gac aac ctg cta caa gcc ctg gag ctc cag 1344

14/23

Pro Ile Glu Asp Ile Gln Asp Asn Leu Leu Gln Ala Leu Glu Leu Gln
435 440 445

ctg aag ctg aac cac cct gag tcc tca cag ctg ttt gcc aag ctg ctc 1392
Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser Ser Gln Leu Phe Ala Lys Leu Leu
450 455 460

cag aaa atg aca gac ctc aga cag att gtc acg gaa cac gtg cag cta 1440
Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val Thr Glu His Val Gln Leu
465 470 475 480

ctg cag gtg atc aag aag acg gag aca gac atg agt ctt cac ccg ctc 1488
Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp Met Ser Leu His Pro Leu
485 490 495

ctg cag gag atc tac aag gac ttg tac tag 1518
Leu Gln Glu Ile Tyr Lys Asp Leu Tyr
500 505

<210> 4

<211> 505

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Glu Thr Leu Gly Asp Ser Pro Ile Asp Pro Glu Ser Asp Ser
1 5 10 15

Phe Thr Asp Thr Leu Ser Ala Asn Ile Ser Gln Glu Met Thr Met Val
20 25 30

Asp Thr Glu Met Pro Phe Trp Pro Thr Asn Phe Gly Ile Ser Ser Val

15/23

35

40

45

Asp Leu Ser Val Met Glu Asp His Ser His Ser Phe Asp Ile Lys Pro
50 55 60

Phe Thr Thr Val Asp Phe Ser Ser Ile Ser Thr Pro His Tyr Glu Asp
65 70 75 80

Ile Pro Phe Thr Arg Thr Asp Pro Val Val Ala Asp Tyr Lys Tyr Asp
85 90 95

Leu Lys Leu Gln Glu Tyr Gln Ser Ala Ile Lys Val Glu Pro Ala Ser
100 105 110

Pro Pro Tyr Tyr Ser Glu Lys Thr Gln Leu Tyr Asn Lys Pro His Glu
115 120 125

Glu Pro Ser Asn Ser Leu Met Ala Ile Glu Cys Arg Val Cys Gly Asp
130 135 140

Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys
145 150 155 160

Gly Phe Phe Arg Arg Thr Ile Arg Leu Lys Leu Ile Tyr Asp Arg Cys
165 170 175

Asp Leu Asn Cys Arg Ile His Lys Lys Ser Arg Asn Lys Cys Gln Tyr

16/23

180

185

190

Cys Arg Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Ser His Asn Ala Ile
195 200 205

Arg Phe Gly Arg Met Pro Gln Ala Glu Lys Glu Lys Leu Leu Ala Glu
210 215 220

Ile Ser Ser Asp Ile Asp Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ala Asp Leu Arg
225 230 235 240

Ala Leu Ala Lys His Leu Tyr Asp Ser Tyr Ile Lys Ser Phe Pro Leu
245 250 255

Thr Lys Ala Lys Ala Arg Ala Ile Leu Thr Gly Lys Thr Thr Asp Lys
260 265 270

Ser Pro Phe Val Ile Tyr Asp Met Asn Ser Leu Met Met Gly Glu Asp
275 280 285

Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu Gln Glu Gln Ser Lys Glu
290 295 300

Val Ala Ile Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln Phe Arg Ser Val Glu Ala
305 310 315 320

Val Gln Glu Ile Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Ile Pro Gly Phe Val Asn

17/23

325

330

335

Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val His Glu
340 345 350

Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met Asn Lys Asp Gly Val Leu
355 360 365

Ile Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu
370 375 380

Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe Met Glu Pro Lys Phe Glu Phe Ala Val
385 390 395 400

Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Asp Leu Ala Ile Phe Ile
405 410 415

Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Lys
420 425 430

Pro Ile Glu Asp Ile Gln Asp Asn Leu Leu Gln Ala Leu Glu Leu Gln
435 440 445

Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser Ser Gln Leu Phe Ala Lys Leu Leu
450 455 460

Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val Thr Glu His Val Gln Leu

18/23

465 470 475 480

Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp Met Ser Leu His Pro Leu
485 490 495Leu Gln Glu Ile Tyr Lys Asp Leu Tyr
500 505

<210> 5

<211> 1300

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1300)

<223>

<400> 5

ccctcagggc ccatagcgca agggcggagg gcacacggac agcggctaga cgccccacag 60

aaagacaagt ccggggacga cccttctgac cgctctttt acagccagga cccaaatgttc 120

ctaccggcct cgccccagtg cctctctctc tcccacagca tactgctgtt ccacggcctc 180

gaagcgaaga ggtggtaag ctgagagacc ctatccaggg aacccgccag cgcgacgccc 240

cgtctgaagg tcacgagccc tgccgacagc ccagacccag tccggctag cccgaggcct 300

ccctggaggt ggacggtttc agtccacaca tactgggacc ccagggagac actcaccagc 360

atccgagcct gccatgttcc agaggcaggt cgccgcccga ctccgacgctg gcccggagg 420

19/23

cgacggtgtc	ctggaaggac	cgatccacgc	agacccgaca	ctggggcgcg	gacgcacgaa	480
ccaaagcgcg	gggaaggagg	cgtgaaagaa	ggacggacgt	taaaagagct	tctcgccgct	540
gattggtcat	cagaggagca	cttcctttca	caggacgtga	aacggggcg	gtttggggaa	600
gttagagac	cattctccgc	cgaccaaaac	ccgtcaaagg	attatcagac	acgcgggtcg	660
gacggtccac	atcagccggc	agcccgggcg	ggtcccgggg	tgcgagcagc	gcacttccgg	720
ttagctattt	cgtttgtat	ccctccgccg	acgtcaacgg	gaaagtatgt	cggaccgctc	780
tctcggtggt	ccgggggtggt	acagccacgt	gacaacgcca	ggcccccgcct	tccccctctt	840
ttggttacag	acgtgagggc	tctttggaga	cgtaaacatc	tccgagtggtc	gagggtggc	900
ggggctgggc	ttgggaaagg	gcgggggtggc	ttgcttgagg	tgtggaaaga	ccagaagaag	960
gtgaggtcaa	gagagtgcag	aatgaggcat	tccaatggtg	ggtggccct	gacctgagag	1020
agtggcgcgg	ggaggggtga	aagcgcggcg	atcctggaac	gccagcgggc	gttgcggcct	1080
atgcgcgagg	ggcggggcga	ttaggtcata	gagcggctcc	cagcggtccc	tgcggcgtag	1140
gaggcggtcc	agactataaa	agcggctgcc	ggaaagcggc	cggcacctca	ttcatttctta	1200
ccggtctcta	gtagtgcagc	ttcggctggt	gtcatcggtg	tccttcctcc	gctgccgccc	1260
ccgcaaggct	tcgccgtcat	cgaggccatt	tccagcgact			1300

<210> 6

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial

20/23

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

agacagttga ctgtatcgga attcatgggt gaaactctgg gagattc

47

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 7

aggagctcct agtacaagtc cttgttagatc

30

<210> 8

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 8

gcgaagaagt ccaaagcggc cgctatgcaa ggcattctg aaaccg

46

<210> 9

<211> 29

21/23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

ggagagatgg gtggcctgcc atgggtatc

29

<210> 10

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

cttctagatc ttattggaa ttcctgttg gcattggata a

41

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 11

gcacagcagg tgcagcaa

18

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

gcaccaccat agatgcaagt agac

24

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 13

aaagtggaga ttgttgccat

20

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 14

ttgactgtgc cgttgaatt

19

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

agggtaccct cagggcccat agcgca

26

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

23/23

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

agctcgagtc gctggaaatg gcctcg

26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/08367

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N5/10, C12N15/09, C12Q1/02, A61K45/00, A61P3/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N5/10, C12N15/09, C12Q1/02, A61K45/00, A61P3/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), REGISTRY (STN), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Endoh H. et al., Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor α ., Mol.Cell.Biol., 1999, Vol.19, No.8, pages 5363 to 5372	1-8
A	Deeb SS. et al., A Prol2Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity., Nat.Genet., 1998, Vol.20, No.3, pages 284 to 287	1-8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 September, 2003 (16.09.03)Date of mailing of the international search report
30 September, 2003 (30.09.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08367

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Pihlajamaki J. et al., The Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator activated receptor gamma 2 is associated with an insulin-sensitive phenotype in families with familial combined hyperlipidemia and in nondiabetic elderly subjects with dyslipidemia., Atherosclerosis., 2000, Vol.151, No.2, pages 567 to 574	1-8
A	Meirchaeghe A. et al., Impact of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma2 Pro12Ala polymorphism on adiposity, lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus., Int.J.Obes.Relat. Metab.Disord., 2000, Vol.24, No.2, pages 195 to 199	1-8
A	Patrone C. et al., Divergent pathways regulate ligand-independent activation of ER alpha in SK-N-BE neuroblastoma and COS-1 renal carcinoma cells., Mol.Endocrinol., 1998, Vol.12, No.6, pages 835 to 841	1-8
A	WO 01/42307 A (SUMITOMO CHEM. CO., LTD.), 14 June, 2001 (14.06.01), & AU 200118868 A & EP 1237925 A1 & JP 2003-516137 A	1-8
A	Suk K. et al., Identification of a novel human member of the DEAD box protein family., Biochim. Biophys.Acta., 2000, Vol.1501, No.1, pages 63 to 69	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08367

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 9

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning "a substance obtained by the above screening method" as described in claim 9, no specific substance is presented in the description as a substance obtained by the screening method. Thus, claim 9 is neither supported by the description nor disclosed (continued to extra sheet)

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP03/08367

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

therein. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unknown what specific compounds are involved therein and what are not. Thus, the above claim is described in an unclear manner. Such being the case, no meaningful search can be made on the invention as set forth in the above claim.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int Cl' C12N5/10, C12N15/09, C12Q1/02, A61K45/00, A61P3/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int Cl' C12N5/10, C12N15/09, C12Q1/02, A61K45/00, A61P3/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), REGISTRY (STN), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Endoh H et al, Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor α ., Mol Cell Biol., 1999, Vol. 19, No. 8, p. 5363-5372.	1-8
A	Deeb SS et al, A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity., Nat Genet., 1998, Vol. 20, No. 3, p. 284-287.	1-8

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとつて自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 09. 03

国際調査報告の発送日

30.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4 B 9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Pihlajamaki J et al, The Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator activated receptor gamma 2 is associated with an insulin-sensitive phenotype in families with familial combined hyperlipidemia and in nondiabetic elderly subjects with dyslipidemia., Atherosclerosis., 2000, Vol. 151, No. 2, p. 567-574.	1 - 8
A	Meirhaeghe A et al, Impact of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma2 Pro12Ala polymorphism on adiposity, lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus., Int J Obes Relat Metab Disord., 2000, Vol. 24, No. 2, p. 195-199.	1 - 8
A	Patrone C et al, Divergent pathways regulate ligand-independent activation of ER alpha in SK-N-BE neuroblastoma and COS-1 renal carcinoma cells., Mol Endocrinol., 1998, Vol. 12, No. 6, p. 835-841.	1 - 8
A	WO 01/42307 A (SUMITOMO CHEM CO LTD) 2001.06.14 &AU 200118868 A &EP 1237925 A1 &JP 2003-516137 A	1 - 8
A	Suk K et al, Identification of a novel human member of the DEAD box protein family., Biochim Biophys Acta., 2000, Vol. 1501, No. 1, p. 63-69.	1 - 8

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. 請求の範囲 9 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲9の「前記スクリーニングにより得られた物質」について、明細書には当該スクリーニング方法により得られた物質として具体的なものが一切記載されていないから、請求の範囲9は明細書により裏付けを欠き、開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのような化合物が含まれ、どのような化合物が含まれないかが全く不明であって前記請求の範囲の記載が不明確である。従って、前記請求の範囲に記載された発明について有意義な調査をすることができない。
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。